

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-513223

(P2019-513223A)

(43) 公表日 令和1年5月23日(2019.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2018-541155 (P2018-541155)	(71) 出願人	500029925 ユニベルシテ・ド・リエージュ UNIVERSITE DE LIEGE ベルギー国、4031 アングルール、ア ヴニユ・プレーエリー 4 Avenue Pre-Aily, 4, B -4031 Angleur, Belgi um
(86) (22) 出願日	平成28年12月8日 (2016.12.8)	(74) 代理人	100110423 弁理士 曾我 道治
(85) 翻訳文提出日	平成30年10月2日 (2018.10.2)	(74) 代理人	100111648 弁理士 梶並 順
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/080348	(74) 代理人	100122437 弁理士 大宅 一宏
(87) 国際公開番号	W02017/162322		
(87) 国際公開日	平成29年9月28日 (2017.9.28)		
(31) 優先権主張番号	16162499.4		
(32) 優先日	平成28年3月25日 (2016.3.25)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨関節炎のバイオマーカーとしてのオステオモジュリン及びオステオモジュリンフラグメント、並びにそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断に使用されるオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメントに関する。本発明は、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化を予後判定及び/又は診断する方法であって、i)哺乳動物の個体の体液のサンプル、好ましくはヒトの血清サンプル中のオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント(単数又は複数)を測定する工程と、ii)健全な個体の体液、好ましくは血清中のレベルに対するオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はそのフラグメント(複数の場合もある)のレベルの低下が、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の発症を示すものであると判断する工程と、を含む、方法に関する。本発明はまた、哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断に使用される、オステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメ

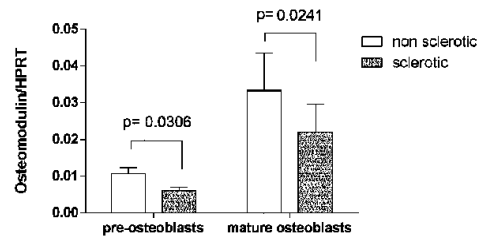


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び／又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び／又は診断における使用のためのオステオモジュリン（OMD）タンパク質又はオステオモジュリン（OMD）タンパク質のフラグメント。

【請求項 2】

健常な個体に対する体液中の前記オステオモジュリンタンパク質又はそのフラグメントの発現の低下又は濃度の低下が骨関節炎及び／又は軟骨下骨の硬化の発症を示す、請求項 1 に記載の使用のためのオステオモジュリン（OMD）タンパク質又はオステオモジュリン（OMD）タンパク質のフラグメント。

10

【請求項 3】

尿、分泌物、間質液、血液、滑液、血清、髄液、及びリンパ液からなる群から選択される体液、好ましくは血清中にて、前記発現の低下又は濃度の低下を測定する、請求項 2 に記載の使用のためのオステオモジュリン（OMD）タンパク質又はオステオモジュリン（OMD）タンパク質のフラグメント。

【請求項 4】

全長オステオモジュリンタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、

オステオモジュリン（OMD）タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸位置 1 ~ 421 で、又はアミノ酸位置 21 ~ 421 で表されるタンパク質であり、

20

前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 21 ~ 148 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 162 ~ 235 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 224 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 421 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c) OMD - (131 ~ 223)、

d) OMD - (236 ~ 296)、

e) OMD - (148 ~ 162)、及び、

30

f) OMD - (261 ~ 276)、

からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用のためのオステオモジュリン（OMD）タンパク質又はオステオモジュリン（OMD）タンパク質のフラグメント。

【請求項 5】

全長オステオモジュリンタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、

オステオモジュリン（OMD）タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸位置 1 ~ 421 で、又はアミノ酸位置 21 ~ 421 で表されるタンパク質であり、

40

前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 131 ~ 148 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 162 ~ 223 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 236 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 296 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c) OMD - (131 ~ 223)、

d) OMD - (236 ~ 296)、

e) OMD - (148 ~ 162)、及び、

f) OMD - (261 ~ 276)、

50

からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用のためのオステオモジュリン (O M D) タンパク質又はオステオモジュリン (O M D) タンパク質のフラグメント。

【請求項 6】

請求項 4 の a)、c) 及び e) に記載のフラグメント、並びに請求項 5 の a)、c) 及び e) に記載のフラグメントが、O M D - (1 4 8 ~ 1 6 2) に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用のためのオステオモジュリン (O M D) タンパク質又はオステオモジュリンタンパク質のフラグメント。

【請求項 7】

請求項 4 の b)、請求項 4 の d) 及び請求項 4 の f) に記載のフラグメント、並びに請求項 5 の b)、請求項 5 の d) 及び請求項 5 の f) に記載のフラグメントが、O M D - (2 6 1 ~ 2 7 6) に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用のためのオステオモジュリン (O M D) タンパク質又はオステオモジュリンタンパク質のフラグメント。

【請求項 8】

骨関節炎及び / 又は軟骨下骨の硬化を予後判定及び / 又は診断する方法であって、

i) 哺乳動物の個体の体液のサンプル、好ましくはヒトの血清サンプル中のオステオモジュリン (O M D) タンパク質又はオステオモジュリン (O M D) タンパク質のフラグメントを測定する工程と、

i i) 健常な個体の体液、好ましくは血清中のレベルに対するオステオモジュリン (O M D) タンパク質又はそのフラグメントのレベルの低下が、骨関節炎及び / 又は軟骨下骨の硬化の発症を示すものであると判断する工程と、

を含む、方法。

【請求項 9】

哺乳動物の個体、好ましくはヒトの個体において骨関節炎及び / 又は軟骨下骨の硬化の治療の治療効果を判定又は確認又は診断する方法であって、

i) 治療中、又は治療後の前記個体の体液のサンプル、好ましくは血清サンプル中のオステオモジュリン (O M D) タンパク質又はオステオモジュリン (O M D) タンパク質のフラグメントを測定する工程と、

i i) 下記の (1) ~ (3) :

(1) 工程 i) で得られた前記サンプル中のオステオモジュリン (O M D) タンパク質若しくはそのフラグメントの正常レベル、又は、

(2) 前記治療前の前記個体の体液のサンプル、好ましくは血清サンプル中のレベルに対する工程 i) で得られた前記サンプル中のオステオモジュリン (O M D) タンパク質若しくはそのフラグメントのレベルの上昇、又は、

(3) 健常な個体の体液のサンプル、好ましくは血清サンプル中のレベルに対する工程 i) で得られた前記サンプル中のオステオモジュリン (O M D) タンパク質若しくはそのフラグメントのレベルの上昇、

のいずれか 1 つが、前記個体における骨関節炎及び / 又は軟骨下骨の硬化の治療の治療効果を示すものであると判断する工程と、

を含む、方法。

【請求項 10】

全長オステオモジュリンタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、

工程 i) で測定されるオステオモジュリン (O M D) タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸位置 1 ~ 4 2 1 で、又はアミノ酸位置 2 1 ~ 4 2 1 で表されるタンパク質であり、

工程 i) で測定される前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 1 ~ 1 4 8 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 1 6 2 ~ 2 3 5 で異なる C 末端アミ

10

20

30

40

50

ノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 224 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 421 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c) OMD - (131 ~ 223)、

d) OMD - (236 ~ 296)、

e) OMD - (148 ~ 162)、及び、

f) OMD - (261 ~ 276)、

からなる群から選択される、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

全長オステオモジュリタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、

工程 i) で測定されるオステオモジュリン (OMD) タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸位置 1 ~ 421 で、又はアミノ酸位置 21 ~ 421 で表されるタンパク質であり、

工程 i) で測定される前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 131 ~ 148 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 162 ~ 223 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 236 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 296 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c) OMD - (131 ~ 223)、

d) OMD - (236 ~ 296)、

e) OMD - (148 ~ 162)、及び、

f) OMD - (261 ~ 276)、

からなる群から選択される、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 10 の a)、請求項 10 の c) 及び請求項 10 の e) に記載のフラグメント、若しくは請求項 11 の a)、請求項 11 の c) 及び請求項 11 の e) に記載のフラグメントが、OMD - (148 ~ 162) に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、及び/又は請求項 10 の b)、請求項 10 の d) 及び請求項 10 の f) に記載のフラグメント、若しくは請求項 11 の b)、請求項 11 の d) 及び請求項 11 の f) に記載のフラグメントが、OMD - (261 ~ 276) に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも 2 つのオステオモジュリンフラグメント種、すなわち請求項 10 の a)、請求項 10 の c) 及び請求項 10 の e)、又は請求項 11 の a)、請求項 11 の c) 及び請求項 11 の e) のいずれか 1 つ、並びに請求項 10 の b)、請求項 10 の d) 及び請求項 10 の f)、又は請求項 11 の b)、請求項 11 の d) 及び請求項 11 の f) のいずれか 1 つを測定する、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 14】

オステオモジュリタンパク質のフラグメントであって、全長オステオモジュリタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 21 ~ 148 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 162 ~ 235 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 224 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 421 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

10

20

30

40

50

- c) OMD - (1 3 1 ~ 2 2 3)、
- d) OMD - (2 3 6 ~ 2 9 6)、
- e) OMD - (1 4 8 ~ 1 6 2)、及び、
- f) OMD - (2 6 1 ~ 2 7 6)、

からなる群から選択される、オステオモジュリタンパク質のフラグメント。

【請求項 15】

オステオモジュリタンパク質のフラグメントであって、全長オステオモジュリタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 1 3 1 ~ 1 4 8 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 1 6 2 ~ 2 2 3 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 3 6 ~ 2 6 1 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 2 7 6 ~ 2 9 6 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

- c) OMD - (1 3 1 ~ 2 2 3)、
- d) OMD - (2 3 6 ~ 2 9 6)、
- e) OMD - (1 4 8 ~ 1 6 2)、及び、
- f) OMD - (2 6 1 ~ 2 7 6)、

からなる群から選択される、オステオモジュリタンパク質のフラグメント。

【請求項 16】

哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断に使用される、オステオモジュリン (OMD) タンパク質又はオステオモジュリン (OMD) タンパク質のフラグメントに特異的に結合する免疫学的結合パートナー。

【請求項 17】

オステオモジュリンフラグメントに特異的に結合する免疫学的結合パートナーであって、全長オステオモジュリタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 1 ~ 1 4 8 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 1 6 2 ~ 2 3 5 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 2 4 ~ 2 6 1 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 2 7 6 ~ 4 2 1 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

- c) OMD - (1 3 1 ~ 2 2 3)、
- d) OMD - (2 3 6 ~ 2 9 6)、
- e) OMD - (1 4 8 ~ 1 6 2)、及び、
- f) OMD - (2 6 1 ~ 2 7 6)、

からなる群から選択される、免疫学的結合パートナー。

【請求項 18】

オステオモジュリンフラグメントに特異的に結合する免疫学的結合パートナーであって、全長オステオモジュリタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、前記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 1 3 1 ~ 1 4 8 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 1 6 2 ~ 2 2 3 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 3 6 ~ 2 6 1 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 2 7 6 ~ 2 9 6 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

- c) OMD - (1 3 1 ~ 2 2 3)、

- d) OMD - (2 3 6 ~ 2 9 6)、
- e) OMD - (1 4 8 ~ 1 6 2)、及び、
- f) OMD - (2 6 1 ~ 2 7 6)、

からなる群から選択される、免疫学的結合パートナー。

【請求項 1 9】

請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の免疫学的結合パートナーを含むキットであって、前記免疫学的結合パートナーが好ましくは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、Fcフラグメント、Fabフラグメント、一本鎖抗体 (scFv)、キメラ抗体、バイオベクター、及び他の抗原特異的抗体フラグメントからなる群から選択される、キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、骨関節炎 (osteoarthritis: 変形性関節症) 及び / 又は軟骨下骨の硬化を診断又は予後判定する方法、並びに骨関節炎のバイオマーカーとしてのオステオモジュリン及びそのフラグメント、並びにそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

骨関節炎 (OA) は、最も一般的な関節症であり、老年集団における関節痛及び身体障害の主な原因である。骨関節炎の病因は、多因子 (すなわち、年齢、肥満、関節損傷、遺伝的素因) であり、その病態生理過程にて関節全体が冒される。関節軟骨の破壊、軟骨下骨の硬化、並びに骨棘の形成、滑膜炎症、並びに靭帯及び半月板の損傷が、OAの主な特徴を構成するものである。

20

【0003】

OAに対する治療方針 (management strategies) を見出すことの他に、疾患の進行の予後判定、診断、及び監視を助けることができ、新たな治療介入の有効性を評価する手段 (tools) を特定することも課題である。これらの手段は、分子レベルでの初期事象を特定し、新規の又は既存の治療法の有効性を客観的に評価するのに十分に精密かつ高感度である必要がある。可溶性バイオマーカーは、これらの手段に含まれると考えられる。

【0004】

これまで、骨関節炎に使用されてきたのは、軟骨由来のバイオマーカーだけである。I型コラーゲン (Col12-1、Col12-1NO2、C2C、PIINP、CTXII)、アグリカン (MMP若しくはADAMTSによって生成されるネオエピトープ、ケラタン硫酸、又はCS846)、COMP、又はフィブリン-3に由来するフラグメントが主に使用されている。

30

【0005】

さらに、この病状を的確に予後判定及び / 又は診断することが可能な単一の特異的マーカーは現在存在していない。そのため、この病状の異なる性状を反映する異なるマーカーの組合せを用いなければならないのが現状である。実際、OAは、危険因子、進行プロファイル、共存症、徴候、及び症状によって定められる異なる臨床表現型を伴う多因子症候群 (heterogeneous syndrome) である。現在、骨関節炎診断法で使用されているのは、軟骨由来のバイオマーカーだけである。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、本発明の技術的課題は、骨関節炎の病状を的確に予後判定及び診断するための新たなマーカー、単一の特異的マーカー、及び方法を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の研究を進める中で、本発明者らは、骨関節炎 (OA) での硬化性の軟骨下の骨

50

芽細胞では、オステオモジュリンがあまり発現されず、またあまり分泌されないことを発見した。さらに、本発明者らは、OA患者の体液、特に血清中にオステオモジュリンのフラグメントを見出し、またそのオステオモジュリンフラグメントの血清濃度が健常な個体のものと比べて低いことを見出した。

【0008】

したがって、本発明は、以下の(1)～(14)を提供する。

【0009】

(1) 哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断における使用のためのオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント。

10

【0010】

(2) 健常な個体に対する体液中の上記オステオモジュリンタンパク質又はそのフラグメント(複数の場合もある)の発現の低下又は濃度の低下が骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の発症を示す、(1)による使用のためのオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント。

【0011】

(3) 尿、分泌物、間質液、血液、滑液、血清、髄液、及びリンパ液からなる群から選択される体液、好ましくは血清中にて、上記発現の低下又は濃度の低下を測定する、(2)による使用のためのオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント。健常な個体に対する上記オステオモジュリン(OMD)タンパク質又はそのフラグメント(複数の場合もある)の体液レベルの低下、特に血清レベルの低下が、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の発症を示す。

20

【0012】

(4) 全長オステオモジュリンタンパク質が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有しており、

オステオモジュリン(OMD)タンパク質が、配列番号1のアミノ酸位置1～421で、又はアミノ酸位置21～421で表されるタンパク質であり、

上記フラグメントが、a)～f)：

a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置21～148で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置162～235で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

30

b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置224～261で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置276～421で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c) OMD - (131～223)、

d) OMD - (236～296)、

e) OMD - (148～162)、及び、

f) OMD - (261～276)、

からなる群から選択される、(1)～(3)のいずれか1つによる使用のためのオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント。

40

【0013】

(5) 好ましいオステオモジュリンフラグメントは、a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置131～148で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置162～223で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、又は、

(b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置236～261で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置276～296で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

である。

50

【0014】

(6)(4)のa)、c)及びe)によるフラグメント、又は(5)のa)によるフラグメントが、OMD-(148~162)に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、(1)~(5)のいずれか1つによる使用のためのオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリンタンパク質のフラグメント。

【0015】

(7)(4)のb)、d)及びf)によるフラグメント、又は(5)のa)によるフラグメントが、OMD-(261~276)に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、(1)~(5)のいずれか1つによる使用のためのオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリンタンパク質のフラグメント。

10

【0016】

(8)骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化を予後判定及び/又は診断する方法であって、
i)哺乳動物の個体の体液のサンプル、好ましくはヒトの血清サンプル中のオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント(単数又は複数)を測定する工程と、

ii)健全な個体の体液、好ましくは血清中のレベルに対するオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はそのフラグメント(複数の場合もある)のレベルの低下が、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の発症を示すものであると判断する工程と、
を含む、方法。

【0017】

20

(9)哺乳動物の個体、好ましくはヒトの個体において骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の治療の治療効果を判定又は確認又は診断する方法であって、

i)治療中、又は治療後の上記個体の体液のサンプル、好ましくは血清サンプル中のオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント(単数又は複数)を測定する工程と、

ii)下記の(1)~(3)：

(1)工程i)で得られた上記サンプル中のオステオモジュリン(OMD)タンパク質若しくはそのフラグメント(複数の場合もある)の正常レベル、又は、

(2)上記治療前の上記個体の体液のサンプル、好ましくは血清サンプル中のレベルに対する工程i)で得られた上記サンプル中のオステオモジュリン(OMD)タンパク質若しくはそのフラグメント(複数の場合もある)のレベルの上昇、又は、

30

(3)健全な個体の体液のサンプル、好ましくは血清サンプル中のレベルに対する工程i)で得られた上記サンプル中のオステオモジュリン(OMD)タンパク質若しくはそのフラグメント(複数の場合もある)のレベルの上昇、

のいずれか1つが、上記個体における骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の治療の治療効果を示すものであると判断する工程と、

を含む、方法。

【0018】

(10)全長オステオモジュリンタンパク質が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有しており、

40

工程i)で測定されるオステオモジュリン(OMD)タンパク質が、配列番号1のアミノ酸位置1~421で、又はアミノ酸位置21~421で表されるタンパク質であり、

工程i)で測定される上記フラグメントが、a)~f)：

a)配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置21~148で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置162~235で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b)配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置224~261で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置276~421で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c)OMD-(131~223)、

50

- d) OMD - (2 3 6 ~ 2 9 6)、
- e) OMD - (1 4 8 ~ 1 6 2)、及び、
- f) OMD - (2 6 1 ~ 2 7 6)、

からなる群から選択される、(8)又は(9)による方法。

【 0 0 1 9 】

(1 1) 工程 i) で測定される好ましいフラグメントは、

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 1 3 1 ~ 1 4 8 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 1 6 2 ~ 2 2 3 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、又は、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 3 6 ~ 2 6 1 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 2 7 6 ~ 2 9 6 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、
である。

【 0 0 2 0 】

(8) ~ (1 1) のいずれか 1 つによる好ましい方法では、工程 i) において体液レベル、好ましくは血清レベルを測定するために、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、F c フラグメント、F a b フラグメント、一本鎖抗体 (s c F v)、キメラ抗体、バイオベクター、及び他の抗原特異的抗体フラグメントからなる群から選択される免疫学的結合パートナーが使用される。

【 0 0 2 1 】

(1 2) (1 0) の a)、c) 及び e) によるフラグメント、若しくは(1 1) の a) によるフラグメントが、OMD - (1 4 8 ~ 1 6 2) に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、及び/又は(1 0) の b)、d) 及び f) によるフラグメント、若しくは(1 1) の b) によるフラグメントが、OMD - (2 6 1 ~ 2 7 6) に対する免疫学的結合パートナーによって特異的に結合される、(1 0) 又は(1 1) による方法。

【 0 0 2 2 】

(1 3) 少なくとも 2 つのオステオモジュリンフラグメント種、すなわち(1 0) の a)、c) 及び e)、又は(1 1) の a) のいずれか 1 つ、並びに(1 0) の b)、d) 及び f)、又は(1 1) の b) のいずれか 1 つを測定する、(1 0) 又は(1 1) による方法。

【 0 0 2 3 】

(1 4) オステオモジュリタンパク質のフラグメントであって、全長オステオモジュリタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、上記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 1 ~ 1 4 8 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 1 6 2 ~ 2 3 5 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 2 2 4 ~ 2 6 1 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 2 7 6 ~ 4 2 1 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c) OMD - (1 3 1 ~ 2 2 3)、

d) OMD - (2 3 6 ~ 2 9 6)、

e) OMD - (1 4 8 ~ 1 6 2)、及び、

f) OMD - (2 6 1 ~ 2 7 6)、

からなる群から選択される、オステオモジュリタンパク質のフラグメント。

【 0 0 2 4 】

(1 5) 好ましいフラグメントは、

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 1 3 1 ~ 1 4 8 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 1 6 2 ~ 2 2 3 で異なる C 末端ア

10

20

30

40

50

ミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、又は、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 236 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 296 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、
である。

【0025】

(16) 哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断に使用される、オステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメントに特異的に結合する免疫学的結合パートナー。

10

【0026】

(17) オステオモジュリンフラグメントに特異的に結合する免疫学的結合パートナーであって、全長オステオモジュリンタンパク質が、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有しており、上記フラグメントが、a) ~ f) :

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 21 ~ 148 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 162 ~ 235 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 224 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 421 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

20

c) OMD - (131 ~ 223)、

d) OMD - (236 ~ 296)、

e) OMD - (148 ~ 162)、及び、

f) OMD - (261 ~ 276)、

からなる群から選択される、免疫学的結合パートナー。

【0027】

(18) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 131 ~ 148 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 162 ~ 223 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、又は、

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置 236 ~ 261 で異なる N 末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置 276 ~ 296 で異なる C 末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、
である好ましいフラグメントに特異的に結合する免疫学的結合パートナー。

30

【0028】

(17) 又は (18) による免疫学的結合パートナーの好ましい実施の形態では、免疫学的結合パートナーは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、Fcフラグメント、Fabフラグメント、一本鎖抗体(scFv)、キメラ抗体、バイオベター、及び他の抗原特異的抗体フラグメントからなる群から選択される。

【0029】

(19) 請求項 16 又は 18 のいずれか 1 つによる免疫学的結合パートナーを含むキットであって、上記免疫学的結合パートナーが好ましくは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、Fcフラグメント、Fabフラグメント、一本鎖抗体(scFv)、キメラ抗体、バイオベター、及び他の抗原特異的抗体フラグメントからなる群から選択される、キット。

40

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は、OAの予後を判定する、及び/又はOAの病状を的確に診断することが可能な単一の特異的マーカーとしてのオステオモジュリン及びそのフラグメントを提供する。特に、本発明は、哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断に使用されるオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオ

50

ステオモジュリンタンパク質のフラグメントを提供する。特に、哺乳動物、好ましくはヒトの個体の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断のマーカーとしてオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリンタンパク質のフラグメント(複数の場合もある)を使用して、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化を予後判定及び/又は診断する方法が提供される。特に、オステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメントは、健全な個体に対する体液中の上記オステオモジュリンタンパク質又はそのフラグメント(複数の場合もある)の発現の低下又は濃度の低下が、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の発症を示すように、上記予後判定及び/又は診断に使用される。更に好ましい実施の形態では、尿、分泌物、間質液、血液、滑液、血清、髄液、及びリンパ液からなる群から選択される体液、より好ましくは血清中にて、発現の低下又は濃度の低下を測定する。 10

【0031】

本発明による方法は、i)哺乳動物の個体の体液のサンプル、好ましくはヒトの血清サンプル中のオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はオステオモジュリン(OMD)タンパク質のフラグメント(単数又は複数)を測定することと、ii)健全な個体の体液レベル、好ましくは血清レベルに対するオステオモジュリン(OMD)タンパク質又はそのフラグメント(複数の場合もある)のレベルの低下が、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の発症を示すものであると判断することを含む。

【0032】

オステオモジュリンは、小ロイシンリッチリピートタンパク質ファミリーの細胞外基質ケラタン硫酸プロテオグリカン成員である。予てより、オステオモジュリンは骨特異的であると考えられてきたが、最近になって、関節軟骨細胞及び関節唇由来の線維軟骨細胞のような他の関節組織でもオステオモジュリンの発現が観察されている。オステオモジュリンの生体活性については殆ど知られていない。オステオモジュリンは、バイオミネラリゼーション(biomineralization:生体内鉱質形成)過程に関与し得るものであり、アルファ(V)ベータ(3)-インテグリンを介した骨芽細胞の結合において機能を果たす。オステオモジュリンは、in vitroにて関節軟骨細胞によるアグリカン発現を刺激することが可能である。ホモ・サピエンス(Homo sapiens)の成熟型のオステオモジュリンは、配列番号1のアミノ酸配列21~421で表される。本出願の配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列には、アミノ酸位置1~20も含まれる。成熟型のタンパク質の分子量は49.5kDaであるが、グリコシル化パターンを踏まえると、およそ60kDa~85kDaと推定される。COOH末端のペプチドが骨ヒドロキシアパタイトに結合する。 20

【0033】

本発明の研究の中で、本発明者らは、プロテオミクス技法を用いることで、軟骨下の初代骨芽細胞のセクレトームに由来する新たな可能性のある可溶性バイオマーカーとしてオステオモジュリン及びそのフラグメントを同定した。本発明者らは、OA中の硬化性の軟骨下の骨芽細胞では、オステオモジュリンがあまり発現されず、またあまり分泌されないことを見出した。さらに、オステオモジュリンのフラグメントがヒト血清中に見出された。オステオモジュリンフラグメントの血清濃度は、健全な個体のものよりも顕著に低いことを見出された。 40

【0034】

得られたデータ及びin vitroでの結果から、オステオモジュリンを、骨関節炎、又は軟骨下骨が変化した骨関節炎患者のサブセットの潜在的バイオマーカーであることみなすことができることが示唆される。血清中のオステオモジュリン又はオステオモジュリンフラグメントのレベルの定量によって疾患の特定状態が示され、それを骨関節炎及び/又は他の加齢に伴う疾患の診断及び予後判定、更には骨関節炎及び/又は加齢に伴う疾患の治療の有効性の監視に用いることができる。

【0035】

哺乳動物の個体における骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化を予後判定及び/又は診断 50

する本発明の方法、並びに骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の治療の治療効果を判定又は確認又は診断する方法では、哺乳動物の骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断のマーカースとしてオステオモジュリン(OMD)タンパク質又は好ましくはオステオモジュリンタンパク質のフラグメント(複数の場合もある)を利用する。これらのフラグメントは、a)~f)からなる群から選択される:

a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置21~148で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置162~235で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸位置224~261で異なるN末端アミノ酸残基を有するとともに、アミノ酸位置276~421で異なるC末端アミノ酸残基を有するオステオモジュリンフラグメント、

c) OMD-(131~223)(OMD1 131-KIDYGVFAKLPNLLQLHLEHNNLEEFPFPLPKSLERLLLGYNIEISKLQTNAMDGLVNLTMLDLCYNYLHDSLKDKIFAKMEKLMQLNLC SNR-223(配列番号2))、

d) OMD-(236~296)(OMD2 236-MYLSLENNSSISSIPEKYFDKLPKLHTLRM SHNKLQDIPYNIIFNLPNIVEL SVGH NK LKQAF-296(配列番号3))、

e) OMD-(148~162)(OMD1a 148-LEHNNLEEFPFPLPK-162(配列番号4))、及び、

f) OMD-(261~276)(OMD2a 261-LRMSHNKLQDIPYNI-276(配列番号5))。

【0036】

血清OMD1、OMD2、OMD1a、及びOMD2a、好ましくはOMD1及びOMD2の定量は、OAの診断及び抗OA療法の経過観察にも用いることができる。さらに、OAが異なる臨床表現型を伴う多因子症候群であることから、オステオモジュリンフラグメントは、患者の疾患の認識を深めるとともに、個別化医療を行うための情報を与えるために、他のOAバイオマーカーと併用することができる。加えて、OMD1、OMD2、OMD1a及びOMD2a、好ましくはOMD1及びOMD2は、硬化性の軟骨下の前骨芽細胞及び骨芽細胞のマーカースとしても使用することができる。

【0037】

OAが軟骨損傷に先んじて起こるか、又は軟骨損傷に続いて起こるかは未だはっきりしていないが、軟骨下骨の硬化は、OAの病態生理における重要な特徴である。軟骨下骨の硬化は、局所骨吸収及び弱く石灰化した類骨物質の集積を特徴とする。軟骨下骨の硬化は、軟骨下骨の機械的性質を変えるだけでなく、軟骨代謝に対して活性のある生化学因子を放出することによっても、軟骨分解に関係している疑いがある。本発明者らによってこれまでに、軟骨下のOA骨から単離された骨芽細胞が、変化した表現型を発現することが明らかとなっている。より正確には、軟骨病変直下にある肥厚化(硬化性(SC)と呼ばれる)軟骨下骨に由来する骨芽細胞がアルカリホスファターゼ(AP)活性の上昇を示し、非肥厚化隣接域(非硬化域(NSC)と呼ばれる)に由来する骨芽細胞よりも高いレベルのIL-6、IL-8、PGE2、TGF- β 1及びI型コラーゲンを発現することが明らかとなった。本発明の研究の中で、この*in vitro*モデルを用いることで、NSC骨芽細胞とSC骨芽細胞とのシグナルを比較した。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】非硬化性細胞又は硬化性細胞における前骨芽細胞又は成熟骨芽細胞によるオステオモジュリン遺伝子の発現を示す図である。mRNAのコピー数を対応するHPRThmRNAのコピー数に対して正規化し、結果は、異なるドナーに由来する骨生検材料を用いて行った5回の独立実験の平均 \pm SEMである。各実験では、各実験条件を2連で行った。平均値の比較を対応のあるt検定によって行った。結果から、硬化性骨芽細胞では非硬

10

20

30

40

50

化骨芽細胞よりもオステオモジュリンの発現が少ないことが示された。

【図2】オステオモジュリン全体に対するヤギポリクローナル抗血清を使用したオステオモジュリンのウェスタンブロッティング検出を示す図である。r h O M D : ヒト組み換えオステオモジュリン(陽性対照)、D M E M : 濃度調整をしていない培養上清(陰性対照)、N S C : 非硬化性骨芽細胞の上清、S C : 硬化性骨芽細胞の上清、s 5 9、s 6 7、s 6 2 : 3人の健常な患者の血清。

【図3】O M D 1ペプチドフラグメント及びO M D 2ペプチドフラグメントに対する抗体を使用したE L I S A試験の結果を示す図である。この図は、非硬化性及び硬化性の前骨芽細胞及び骨芽細胞の培養上清におけるO M D 1濃度及びO M D 2濃度を示している。このE L I S A試験を用いることで、骨芽細胞の培養上清中にオステオモジュリンフラグメントが検出され、更に非硬化性セクレトームに対する硬化性セクレトームにおけるO M D 1及びO M D 2の低減が確認された。

【図4】ヒト血清中のO M D 1及びO M D 2のレベルの分析結果を示す図である。33人の健常患者及び24人のO A患者にて定量を行った。健常集団において、11人が20歳~30歳であり、12人が31歳~45歳であり、10人が46歳~65歳であった。O A集団における年齢範囲は、44歳~83歳であった。O M D 1及びO M D 2がどちらも、健常患者に対してO Aで有意に低かった。

【図5】モルモットのO A自然発症モデルの血清中のO M D 1及びO M D 2の定量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0039】

定義

本明細書で使用される「オステオモジュリタンパク質」、すなわち「O M D」は、配列番号1のアミノ酸配列1~421で表されるホモ・サピエンスオステオモジュリンを指す。好ましい実施形態では、「オステオモジュリタンパク質」、すなわち「O M D」、特に骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化の予後判定及び/又は診断に用いられる「オステオモジュリタンパク質」、すなわち「O M D」は、配列番号1のアミノ酸配列21~421で表されるホモ・サピエンスの成熟型のオステオモジュリンを指す。

【0040】

「サンプル」は、配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドを含む、又は含むことが疑われる、生物から得られる任意の生体サンプル、特に体液を意図するものである。示されるように、生体サンプルとしては、ポリペプチド及び/又はペプチドを含む体液、並びにポリペプチド及び/又はペプチドを発現することが見出されている他の組織源が挙げられる。生物から組織生検材料及び体液を得る方法は当該技術分野において既知である。尿、分泌物、間質液、血液、滑液、血清、髄液、及びリンパ液等の体液由来のサンプルが特に好ましく、血清が最も好ましい。

【0041】

「免疫学的結合パートナー」又は「抗体」という用語は、同義に用いられるとともに、最も広い意味で用いられ、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、F cフラグメント、F a bフラグメント、及び所望の生物学的若しくは免疫学的活性を示す抗体フラグメント、一本鎖抗体(s c F v)、キメラ抗体、バイオベター、又は配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5に示されるポリペプチド及びペプチドに特異的に結合する他の抗原特異的抗体フラグメントを特に包含するものである。「免疫グロブリン」(I g)という用語は、本明細書では「抗体」と区別なく用いられる。

【0042】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、場合により微量に存在し得る自然発生突然変異の場合を除き、集団に含まれる個々の抗体は同一である。モノクローナル抗体は、特異性が

10

20

30

40

50

高く、単一抗原部位に対するものである。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物に比して、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基に対するものである。モノクローナル抗体は、その特異性に加えて、他の抗体を混入させずに合成することができるという利点がある。「モノクローナル」という修飾句は、何らかの特定の方法で抗体を作製することを要求するものとはみなされない。例えば、本発明に有用なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製してもよく、又は細菌、真核性の動物若しくは植物の細胞における組換えDNA法を用いて作製してもよく、又はファージ抗体ライブラリから単離してもよい。

【0043】

本明細書ではモノクローナル抗体には、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来の、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一であるか、又は相同である一方で、該鎖の残りが、別の種由来の、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一であるか、又は相同である「キメラ」抗体だけでなく、所望の生体活性を示す限りにおいて、かかる抗体のフラグメントも含まれる。本明細書で対象となるキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿等）由来の可変ドメインの抗原結合配列と、ヒトの定常領域配列とを含む「霊長類化（primatized）」抗体が含まれる。

10

【0044】

「インタクト」抗体は、抗原結合部位と、C Lと、少なくとも重鎖定常ドメインC H 1、C H 2及びC H 3とを含むものである。

20

【0045】

「抗体フラグメント」は、インタクト抗体の一部、好ましくはインタクト抗体の抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、及びF vフラグメント；ダイアボディ；直鎖抗体；一本鎖抗体分子；並びに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【0046】

抗体のパパイン消化によって、「F a b」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメントと、残る「F c」フラグメント（易結晶化能を反映した名称である）とが生じる。F a bフラグメントは、H鎖の可変領域ドメイン（V H）、及び1本の重鎖の第1の定常ドメイン（C H 1）とともに、L鎖全体からなる。各F a bフラグメントは、抗原結合に関して一価であり、すなわち単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理によって、二価の抗原結合活性を有するジスルフィド結合したF a bフラグメント2つに概ね対応するが、抗原を架橋することが依然可能である、単一で大型のF (a b')₂フラグメントが得られる。F a b'フラグメントは、C H 1ドメインのカルボキシ末端に抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む数残基を更に有することが、F a bフラグメントとは異なる。F a b' - S Hは本明細書では、定常ドメインのシステイン残基（複数の場合もある）に遊離チオール基が付されているF a b'に対する名称である。F (a b')₂抗体フラグメントは元々、ヒンジシステインが間に存在するF a b'フラグメント対として産生された。抗体フラグメントの他の化学結合も知られている。

30

【0047】

F cフラグメントは、ジスルフィドによって結合された両H鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、F c領域の配列によって決まり、この領域は或る特定種の細胞に認められるF c受容体（F c R）によっても一部認識される。

40

【0048】

「F v」は、完全な抗原認識部位と抗原結合部位とを含む最小抗体フラグメントである。このフラグメントは、強固に非共有結合的に結び付いた、1つが重鎖可変領域ドメインであり、1つが軽鎖可変領域ドメインであるダイマーからなる。これら2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性をもたらす、6つの超可変ループ（H鎖及びL鎖それぞれから3ループ）が出る。しかしながら、単一可変ドメイン（すなわち、抗原に特異的なC D Rを3つしか含まない

50

Fvの半分)であっても、結合部位全体よりも親和性が低いが、抗原を認識し、結合することができる。

【0049】

「一本鎖Fv」は、「sFv」又は「scFv」とも略され、単一ポリペプチド鎖へと連結したVH抗体ドメイン及びVL抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。好ましくは、sFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーを更に含み、このリンカーによって、sFvが抗原結合に望ましい構造を形成することが可能となる。

【0050】

「ダイアボディ」という用語は、Vドメインの鎖内対合ではなく、鎖間対合が達成され、二価フラグメント、すなわち2つの抗原結合部位を有するフラグメントがもたらされるように、VHドメインとVLドメインとの間の短リンカー(約5残基~10残基)を用いてsFvフラグメントを構築することにより作製される小抗体フラグメントを指す。二重特異性ダイアボディは、2つの抗体のVHドメイン及びVLドメインが異なるポリペプチド鎖に存在する2つの「クロスオーバー(crossover)」sFvフラグメントのヘテロダイマーである。

【0051】

「ヒト化」型の非ヒト(例えば、齧歯類)抗体は、非ヒト抗体由来の最小配列を含むキメラ抗体である。殆どの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基を、所望の抗体特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長類等の非ヒト種の超可変領域の残基(ドナー抗体)に置き換えたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)の残基を対応する非ヒト残基に置き換えることもある。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体に認められない残基を含んでいてもよい。これらの改変は、抗体性能を更に改善するために行われる。概して、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通例2つの可変ドメインを実質的に全て含み、ここで、超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、更に任意に免疫グロブリン、通例ヒト免疫グロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部を含む。

【0052】

対象の抗原、例えば配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチド「に結合する」抗体又は他の有機分子は、該抗体又は他の有機分子が、抗原を発現する細胞、組織及び/又は体液中の診断剤として有用であり、他のタンパク質と大きく交差反応しないように、十分な親和性を持って抗原と結合するものである。かかる実施形態では、抗体又は他の有機分子と、「非標的」タンパク質との結合の程度は、放射性免疫沈降法(RIA)にて判定する場合、抗体又は他の有機分子とその特定の標的タンパク質との結合の約10%未満である。抗体又は他の有機分子と標的分子との結合について、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープ「への特異的な結合」又は「に特異的に結合する」又は「に対して特異的な」という用語は、非特異的な相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、概して類似の構造であるが、結合活性を有しない分子である対照分子の結合に対して分子の結合を判定することによって測定することができる。例えば、特異的な結合は、標的と類似の対照分子、例えば過剰な非標識化標的との競合作用によって判定することができる。この場合、標識化標的とプローブとの結合が過剰な非標識化標的によって競合阻害される場合に、特異的な結合が示される。本明細書で用いられる、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープ「への特異的な結合」又は「に特異的に結合する」又は「に対して特異的な」という用語は、例えば、標的に対するKdが、少なくとも約 10^{-4} M、好ましくは少なくとも約 10^{-5} M、好ましくは少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは少なくとも約 10^{-7} M、好ましくは少なくとも約 10^{-8} M、好ましくは少なくとも約 10^{-9} M、好ましくは少なくとも約 10^{-10} M、好ましくは少な

10

20

30

40

50

くとも約 10^{-11} M、好ましくは少なくとも約 10^{-12} M、又はそれ以上である分子によって示すことができる。一実施形態では、「特異的な結合」という用語は、任意の他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへの実質的な結合なく、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに分子が結合する結合を指す。

【0053】

本明細書で用いる場合、「標識」という語は、「標識化された」抗体、オリゴペプチド、又は他の有機分子が生じるように、抗体、オリゴペプチド、又は他の有機分子と直接又は間接的に共役する検出可能な化合物又は組成物を指す。標識は、自身が検出可能であってもよく（例えば、放射性同位元素標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物若しくは組成物の化学変化を触媒するものであってもよい。

10

【0054】

「ウェスタンブロット」、「ウェスタンイムノブロット」、「イムノブロット」及び「ウェスタン」という用語は、メンブレン支持体上に固定されているタンパク質（複数の場合もある）、ポリペプチド、又はペプチドの免疫学的分析を指す。タンパク質を初めにポリアクリルアミドゲル電気泳動（すなわち、SDS-PAGE）によって分割することで、タンパク質を分離し、続いてゲルからニトロセルロースメンブレン又はナイロンメンブレン等の固体支持体へとタンパク質を転写する。次いで、固定されたタンパク質を対象の抗原に対する反応性を有する抗体に曝す。抗体（すなわち、一次抗体）の結合は、一次抗体へと特異的に結合する二次抗体の使用により検出される。二次抗体は、色の付いた反応生成物の生成により抗原-抗体複合体の可視化が可能であるか、又は発光性酵素反応を触媒する酵素に共役するもの（例えば、ECL試薬、Amersham社）であるのが通例である。

20

【0055】

本明細書で用いる「ELISA」という用語は、酵素結合免疫吸着法（すなわちEIA）を指す。多くのELISA法及び用途が当該技術分野で知られており、多くの文献（例えば、Crowther, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)," in Molecular Biometrics Handbook, Rapley et al. [eds.], pp. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N. J. [1998]、Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press [1988]、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Ch. 11, John Wiley & Sons, Inc., New York [1994]を参照されたい）で記載されている。加えて、商業的に利用可能なELISA試験システムが多く存在する。

30

【0056】

ELISA法の1つが、サンプル中の抗原（例えば、配列番号1～配列番号5、好ましくは配列番号2～配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチド）を検出する「直接ELISA」である。直接ELISAの一実施形態では、抗原を含有するサンプルを、固体（すなわち、静止又は固定）支持体（例えば、マイクロタイタープレートウェル）に曝す。サンプル中の抗原が静止相に固定され、抗原に特異的な酵素共役抗体を用いて直接検出される。

【0057】

代替的な実施形態では、抗原に特異的な抗体をサンプルにて検出する。この実施形態では、抗体（例えば、配列番号1～配列番号5、好ましくは配列番号2～配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドに特異的な抗体）を含有するサンプルを、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートウェル）に固定する。続いて、精製抗原及び抗原に特異的な酵素共役抗体を用いて、抗原特異的抗体を検出する。

40

【0058】

別の代替的な実施形態では、「間接ELISA」が用いられる。一実施形態では、直接ELISAと同様に、抗原（又は抗体）を固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートウェル）に固定するが、初めに抗原特異的抗体（又は抗原）を添加した後、当業者に既知の様々な製造業者から入手可能である、「種特異的な」抗体としても知られている、抗原に特異的に結合する抗体に特異的な検出抗体（例えば、ヤギ抗ウサギ抗体）を添加する

50

ことにより間接的に検出される。

【0059】

他の実施形態では、「サンドイッチELISA」が用いられる。ここで、固体支持体に固定され、対象の抗原に結合することが可能である抗体（すなわち、捕捉抗体）を介して、抗原（例えば、試験サンプルに含まれる抗原）を固体支持体（例えば、マイクロタイタープレート）上に固定する。好適な捕捉抗体を固定相に貼り付けた後、サンプルをマイクロタイタープレートウェルに加え、続いて洗浄を行う。対象の抗原がサンプルに存在する場合、該抗原は、支持体上に存在する捕捉抗体に結合する。幾つかの実施形態では、サンドイッチELISAは、捕捉抗体が、抗原に対する酵素共役抗体を用いることで直接検出される「直接サンドイッチ」ELISAである。代替的には、他の実施形態では、サンドイッチELISAは、抗原特異的な抗体に結合する別の酵素共役抗体によって後に検出される、抗原に対する抗体を用いることで、抗体-抗原-抗体-抗体複合体を形成することにより、捕捉抗体を間接的に検出する「間接サンドイッチ」ELISAである。次いで、三次抗体を検出するのに好適なレポーター試薬を加える。代替的には、幾つかの実施形態では、抗原-抗体複合体を検出するために、必要に応じて任意数の更なる抗体を加える。幾つかの好ましい実施形態では、これらの更なる抗体は、可視化及び/又は定量が可能となるように標識化又はタグ付けされる。

10

【0060】

本明細書で用いられる「捕捉抗体」という用語は、抗原の検出前に、サンプル中の抗原に結合する（すなわち抗原を補足する）、サンドイッチELISAに使用される抗体を指す。例えば、幾つかの実施形態では、配列番号1～配列番号5、好ましくは配列番号2～配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドに対するポリクローナル抗体が、マイクロタイタープレートウェルに固定される場合の捕捉抗体として働く。この捕捉抗体が、ウェルに加えられるサンプルに存在するポリペプチド及び/又はペプチドに結合する。本発明の一実施形態では、アビジン被覆固体支持体とともに、ビオチン化捕捉抗体が本発明で使用される。次いで、抗原-抗体複合体に結合し、それを検出するのに別の抗体（すなわち、検出抗体）が使用され、要するに抗体-抗原-抗体で構成される「サンドイッチ」が形成される（すなわち、サンドイッチELISA）。

20

【0061】

本明細書で用いられる「検出抗体」は、可視化又は定量の手段、通例、好適な基質を添加した後には色の付いた又は蛍光反応生成物を通例生じる共役酵素部分を保有する抗体である。ELISAにおいて検出抗体とともに一般的に使用される共役酵素としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコアミラーゼ、及びβ-ガラクトシダーゼが挙げられる。幾つかの実施形態では、検出抗体は、対象の抗原に対するものであり、他の実施形態では、検出抗体は、対象の抗原に対するものではない。幾つかの実施形態では、検出抗体は抗種（anti-species）抗体である。代替的には、検出抗体は、ビオチン、蛍光マーカー、若しくは放射性同位元素等の標識にて調製され、この標識を用いて検出及び/又は定量される。

30

【0062】

本明細書で用いられる「レポーター試薬」、「レポーター分子」、「検出基質」及び「検出試薬」という用語は、抗原に結合する抗体の検出及び/又は定量を可能にする試薬について用いられる。例えば、幾つかの実施形態では、レポーター試薬は、抗体へと共役している酵素に対する発色基質である。抗体-酵素コンジュゲートへと好適な基質を加えることで、発色又は蛍光シグナルの発生が（例えば、対象の抗原への共役抗体の結合の後に）起こる。他のレポーター試薬としては、放射性化合物が挙げられるが、これに限定されない。この定義には、検出システムの一部としてのビオチン及びアビジン系の化合物（例えば、ニュートラアビジン及びストレプトアビジンが挙げられるが、これらに限定されない）の使用も含まれる。

40

【0063】

本明細書で用いられる「シグナル」という用語は、反応が起こっていることを示す任意

50

の検出可能なプロセス、例えば抗体の抗原への結合について一般的に用いられる。放射能、蛍光性又は発光性の生成物/試薬の形態のシグナルが全て、本発明にて使用されることが企図される。本発明の様々な実施形態では、シグナルは定性的に評価され、代替的な実施形態では、シグナルは定量的に評価される。

【0064】

本明細書で用いられる「増幅試薬 (amplifier)」という用語は、E L I S A等の検出法においてシグナルを増強するシステム (例えば、E L I S Aに使用されるアルカリホスファターゼ増幅システム) について用いられる。

【0065】

ポリペプチドを検出する方法

配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5のポリペプチド又はペプチドについて、任意の有効な方法に従って検出、可視化、判定、定量等を行うことができる。有用な方法としては、イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ (R I A)、E L I S A、免疫蛍光、フローサイトメトリー、組織学的検査、電子顕微鏡検査、光学顕微鏡検査、in situアッセイ、免疫沈降法、ウェスタンブロット等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0066】

イムノアッセイは、液体中又は支持体上で行うことができる。例えば、サンプル (例えば、血液、尿、組織、体液、好ましくは血清) を、ニトロセルロース、又は細胞、細胞粒子若しくは可溶性タンパク質を固定することができる他の固体支持体等の固相支持体又は担体に接触させ、その上に固定することができる。次いで、支持体を好適なバッファーで洗浄した後、配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5のポリペプチド又はペプチドを特異的に認識する検出可能に標識された抗体で処理することができる。続いて、固相支持体を再度バッファーで洗浄し、結合していない抗体を除去することができる。その後、固相支持体上に結合した標識の量を従来手段によって検出することができる。

【0067】

骨及び/又は軟骨障害、例えば骨関節炎の診断

本発明は、好ましくは血清サンプルにて測定される、配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドの発現及び/又は濃度の低下に基づき、哺乳動物において骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化等の骨及び/又は軟骨障害を予後判定及び/又は診断する方法も提供する。本発明は、かかる障害と関連される有益な臨床マーカーを提供する。

【0068】

かかる方法は、配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドが、正常サンプルに比べて試験サンプルにて低発現されているか判定することを含む。配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5のポリペプチドは、本出願の実施例に示されるように、ヒト骨において選択的に発現される。患者由来のサンプルにおける配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドの存在の低下が、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化を示す。アッセイは、例えば、ウェスタンブロットアッセイ又はE L I S A等の定量アッセイによって、或る特定のタンパク質のレベル (既知の正常対照と比べたレベル) を測定する任意の標準法を用いて行う。例えば、配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドに特異的な抗体を用いる標準的な競合E L I S A方式を用いて、ポリペプチドのレベルを定量する。代替的には、捕捉抗体として一次抗体、及び検出抗体として配列番号1~配列番号5、好ましくは配列番号2~配列番号5から選択されるポリペプチド又はペプチドに特異的な二次抗体を用いるサンドイッチE L I S Aが用いられる。

【0069】

一実施形態では、この方法は、(a) 骨及び/又は軟骨障害の疑いがある患者から試験

10

20

30

40

50

サンプルを得ることと、(b) 配列番号 1 ~ 配列番号 5、好ましくは配列番号 2 ~ 配列番号 5 からなる群から選択されるポリペプチドをアッセイすることにより、配列番号 1 ~ 配列番号 5、好ましくは配列番号 2 ~ 配列番号 5 からなる群から選択されるポリペプチドの発現レベルを検出することと、(c) 上記レベルと健常な対照のレベルとを比較することを含み、対照における配列番号 1 ~ 配列番号 5、好ましくは配列番号 2 ~ 配列番号 5 からなる群から選択されるポリペプチドの発現レベルに対する配列番号 1 ~ 配列番号 5、好ましくは配列番号 2 ~ 配列番号 5 からなる群から選択されるポリペプチドの発現レベルの低下が、骨関節炎及び/又は軟骨下骨の硬化等の骨及び/又は軟骨障害の陽性結果を示す。

【0070】

10

本発明を下記実施例にてより詳細に説明するが、本実施例は何ら限定的なものとは理解されない。

【実施例】

【0071】

実施例 1：軟骨下の骨芽細胞の細胞培養

膝関節置換術を受けた 10 人の OA 男性から脛骨の軟骨下の骨プレートを得た。患者の年齢は 42 歳 ~ 83 歳の範囲であった。骨梁及び関節軟骨を慎重に取り除いた後、OA 軟骨下骨を解剖し、非硬化 (NSC) 域と SC 域とを分けた。厚さが 2 mm を超え、剥離した、又は線維化 (fibrillated) 軟骨で覆われた軟骨下骨域のみを SC 骨とした。また、最大厚さが 1 mm の軟骨下骨域のみを NSC 骨とした。次いで、外植片から増生することで、SC 又は NSC 軟骨下骨由来の骨芽細胞を得た。同時に、初代細胞をトリプシン処理により回収し、12 ウェルプレート (12 ウェルのコンパニオンプレート、Falcon、BD Biosciences 社) に播種して (50000 細胞 / cm^2)、10% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、10 mM HEPES を含む DMEM 中で 3 日間、増殖させた。この段階の細胞は前骨芽細胞 (アルカリホスファターゼ活性なし) と考えられた。前骨芽細胞は、直接、又は 100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、10 mM HEPES、2% Ultraser G、血清代替物、 10^{-8} M $1,25-(\text{OH})_2$ -ビタミン D3 (Sigma-Aldrich 社、ベルギー)、2 mM グルタミン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸及び 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロリンを含む DMEM で構成される分化培地内で更に 14 日間、維持することにより成熟骨芽細胞へと分化して使用した。この分化期間の終わりに、細胞は、オステオカルシン及びアルカリホスファターゼの産生を特徴とする骨芽細胞/骨細胞の表現型を発現し、 α -グリセロリン酸の存在下にて基質を石灰化することが可能であった。

20

30

【0072】

実験のために、前骨芽細胞又は成熟骨芽細胞をリンスした後、BSA/FBS 不含培地にて 72 時間、培養した。使用する栄養培地は、1% ITS (Lonza 社、ベルギー)、10 mM HEPES、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、2 mM グルタミン (Lonza 社、ベルギー)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich 社、ベルギー)、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロリン (Invitrogen 社、ベルギー) が添加された DMEM とした。ITS は、1 ml に、0.625 mg のインスリン、0.625 mg のトランスフェリン、0.625 μg の亜セレン酸を含む予混細胞増殖システムである。これらの調整された 72 時間上清を用いて、セクレトーム分析を行った。

40

【0073】

実施例 2：プロテオミクス分析

骨関節炎の骨芽細胞セクレトームのプロテオミクス分析を、nanoUPLC-Synapt HDMS G2 システム (Waters 社) での差次定量及び相対無標識分析を用いて行った。1 人の患者を用いて、検証試験を行ってから、NSC セクレトームと SC セクレトームとを適合させた他の 5 人の患者を分析した。

【0074】

LC-ESI-MS/MS によるタンパク質同定

50

サンプルを、還元し、アルキル化 / 還元し、メンブレンカットオフ値が 3 k D a の A m i c o n (Millipore社)を用いて濃縮した。次いで、サンプルのタンパク質含量を、R C D Cキット (Biorad社)を用いて定量した。各サンプルにつき 1 5 μ g のアリコートをし、還元し、アルキル化 / 還元し、メンブレンカットオフ値が 3 k D a の A m i c o n (Millipore社)を用いて濃縮した後、2 D - C l e a n u pキット (GE社)を製造業者の推奨に従って適用し、質量分析に適合しない不純物を除いた。洗浄工程後のタンパク質ペレットを更に、5 0 m M 重炭酸アンモニウムに再可溶化した (resolubilized)。サンプルを、トリプシンを含む溶液中で消化した (8 0 % A C N 中、トリプシン / 総タンパク質比 (W / W) (1 / 5 0) にて 3 7 ° C で 1 6 時間、1 / 1 0 0 比にて 3 7 ° C で 3 時間)。ギ酸の添加により、反応を停止させた。サンプルを高速真空下にて蒸発乾固した。サンプルを 0 . 1 % ギ酸水溶液に再溶解させた後、各サンプルにつき 3 . 5 μ g のタンパク質消化物に相当するアリコートを、製造業者の推奨に従って、Z i p - T i p C 1 8 H i g h C a p a c i t y を使用して精製した。サンプルを高速真空下にて蒸発乾固した。

10

【0075】

ペプチドは、1 0 0 m M ギ酸アンモニウム中、3 . 0 μ g で調整して、A D H 中、体積当たり 1 5 0 f m o l を M P D S ミックス標準 (Waters社)のために注入した。M P D S ミックス 1 又はミックス 2 をサンプル間で異なる比率で混ぜた内部標準により、2 D - U P L C 分離全体の技術的検証、更なるイオン移動度分離による M S - M S E データ収集、P L G S 同定プロセス、及び更には相対定量分析が可能になる。A D H は、M P D S 1 / M P D S 2 = 1 の比率で存在する。

20

【0076】

n a n o U P L C - S y n a p t (商標) H D M S (商標) G 2 システム (Waters社)での差次定量及び相対無標識分析

この方法の原理は、複合サンプルのトリプシンペプチド消化物を定量的に比較することであり、異なる市販内部標準を混ぜることで、相対的定量が可能となる。高効率イオン移動度 (I M S) 及び飛行時間型質量分析 (T O F - M S) と、Waters社により開発された統計ソフトウェアとを合わせたこの質量分析計の高い感度、分解能、及び質量精度により、比較対象の元のペプチドミックスに存在するペプチド及びタンパク質の信頼性のある同定が可能となる。

30

【0077】

S y n a p t (商標) H D M S (商標) G 2 質量分析計では、エレクトロスプレーイオン化源 (E S I) が用いられ、分析されるペプチドに対して、高分解能及び高い質量精度 (1 0 p p m 内) を伴う高感度検出 (下限およそ 0 . 1 f m o l ~ 1 f m o l のタンパク質) が可能である。全てのペプチドをフラグメント化し (M S E)、データベース検索を行い、フラグメント化された親ペプチドそれぞれで測定された精密質量へと関連させることで、ペプチドの配列及び同一性を得た。

【0078】

P r o t e i n L y n x G l o b a l S E R V E R v s 2 . 5 による統計分析は、ペプチド及びタンパク質の同定と、異なる存在比で比較される両サンプルに存在する幾つかのタンパク質消化物で構成される第 2 の内部標準の同時分析に基づく相対的定量とを含むものであった。この無標識定量法のリニアダイナミックレンジは、およそ 3 桁 ~ 4 桁であった。

40

【0079】

P L G S 分析

タンパク質同定は、スパイク (spikes) として用いられるタンパク質配列及び内部標準 : M P D S ミックスを手動で加える U N I P R O T S u s C r o f a から抽出したデータベースを用いて行った。

【0080】

P L G S スコアは、タンパク質同定についての信頼度と相関する確率的スコアである。

50

したがって、高い値のPLGSスコアは、MS及びMSEによって、高い質及び量の情報が観察されたことと相関する。このスコアは、データベース検索後のタンパク質に帰するものである。このデータベース検索は、偽陽性タンパク質同定のリスクを評価するために元のデータベースから再計算されたランダム化データベースでの検索も含む。同定のためには、異なるペプチドは同定されるタンパク質当たり少なくとも2つが最小と考えられ、偽陽性率を確認するために、これはできる限り小さくするべきである(PLGSデータベース検索に用いられる設定のために、偽陽性率は最大で4%となる)。

【0081】

この結果から、オステオモジュリンは、硬化性セクレトームよりも非硬化性セクレトームで豊富に存在することが分かる。上述のように、骨関節炎の骨芽細胞セクレトームのプロテオミクス分析を、nanoUPLC-Synapt HDMS G2システム(Waters社)での差次定量及び相対無標識分析を用いて行うことで、非硬化性骨芽細胞と硬化性骨芽細胞との間のタンパク質産生に差があることを発見した。6人の患者を用いたこのプロテオミクス分析にて、オステオモジュリンタンパク質の産生は、4人の患者では非硬化性骨芽細胞と比べて硬化性骨芽細胞において60%低下しており($p < 0.001$)、他の2人の患者では硬化性骨芽細胞セクレトームにおいて検出不能であることが見出された。

10

【0082】

加えて、オステオモジュリンの異なるペプチドフラグメント(フラグメントA~H)をプロテオミクス分析にて見出し、ヒトの体液、すなわち滑液、尿、血漿由来のデータに適合させた。オステオモジュリンのフラグメント及びフラグメントが見出された試験サンプルを下記表1にまとめる。

20

【0083】

【表1】

表1：プロテオミクス分析によって同定されたオステオモジュリンのフラグメント

フラグメント	配列番号1に関するアミノ酸配列	源
F、D及びB	131~176	滑液、尿、血漿
G	214~223	尿、血漿
E	269~291	尿、血漿
A	300~314	血漿
H	342~366	血漿

30

【0084】

実施例3：骨芽細胞におけるオステオモジュリンの発現。定量的リアルタイムRT-PCRによる測定

骨芽細胞におけるオステオモジュリンの発現を示すために、オステオモジュリンのmRNAレベルを5人の患者で分析した。 1×10^6 個の細胞由来のRNAを、RNeasyミニキットのトータルRNA単離システム(Qiagen社、ベルギー)により単離し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、LightCycler-SYBRプレミックスExTaq(Takara社、ベルギー)を用いて行った。PCRテンプレート源は、3ngのファーストストランド(first-strand) cDNA又は精製DNA標準のいずれかとした。下記のプライマー配列を用いて、所望のcDNAを増幅した：HPRTフォワード5'-TGTAATGACCAAGTCAACAAGGG-3'(配列番号6)及びリバーズ5'-TGCCCTGACCAAGGAAGAAGC-3'(配列番号7)、オステオモジュリン(OMD)フォワード5'-TCCTGGTTTGCCTTCTTCACTT-3'(配列番号8)及びリバーズ5'-GGGTCAATAGAAGGACACATCAC-3'(配列番号9)。ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)を内部標準として使用し、OMDとHPRTとの比を算出した。5人の患者を分析したが、そのうちの4人はプロテオミクス分析に用いた以外のものである。

40

【0085】

50

結果から、非硬化性骨芽細胞よりも硬化性骨芽細胞でオステオモジュリンの発現が低いことが分かった。オステオモジュリンのmRNAレベルを5人の患者で分析した。結果として、非硬化性前骨芽細胞と硬化性前骨芽細胞とで 0.57 ± 0.19 倍(図1、 $p = 0.0306$)及び非硬化性成熟骨芽細胞と硬化性成熟骨芽細胞とで 0.66 ± 0.27 倍(図1、 $p = 0.0241$)が観察された。図1には、非硬化性細胞又は硬化性細胞における前骨芽細胞又は成熟骨芽細胞によるオステオモジュリン遺伝子の発現が示されている。mRNAのコピー数を対応するHPRT mRNAのコピー数に対して正規化し、結果は、異なるドナーに由来する骨生検材料を用いて行った5回の独立実験の平均 \pm SEMである。各実験では、各実験条件を2連で行った。平均値の比較を対応のあるt検定によって行った。

10

【0086】

実施例4：ウェスタンブロッティングによるヒト血清中でのオステオモジュリン及びオステオモジュリンフラグメントの存在の検出

オステオモジュリン又はオステオモジュリンフラグメントがヒト血清中に存在し、バイオマーカーとして標的とすることができるといふこの仮説を評価するために、ヒト血清サンプルを、3人の健常な患者及び骨芽細胞の培養上清においてオステオモジュリントタンパク質全体に対するヤギポリクローナル抗血清(R&D systems社)を用いるウェスタンブロットによって分析した。

【0087】

6人の健常者及び6人の重度のOA罹患者という12人の男性の血清をウェスタンブロッティング実験に使用した。実験前に、ProteoPrepキット(Sigma社)を用いて血清のIgG及びアルブミンを枯渇させた。このプロセスの間に、血清を、およそ3.3倍希釈した。軟骨下の骨芽細胞の上清を、Amicon Ultra 3kDa 2mlカラム(Millipore社)を用いて20倍濃縮した。枯渇血清($15 \mu\text{l}$)又は骨芽細胞を濃縮した上清($6 \mu\text{l} = 6 \mu\text{g}$ の総タンパク質)を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(9%)によって分画し、PVDfメンブレンに転写した。メンブレンを、Roche社ブロッキング試薬を用いて4で一晚、ブロッキングした。次いで、メンブレンを、オステオモジュリントタンパク質全体に対する親和性精製したビオチン化ヤギポリクローナル抗血清(BAF2884、R&D systems社)を0.5%のRoche社のブロッキング試薬で1:200希釈したものととも4で一晚インキュベートした。ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)(1:2500希釈)を検出に使用した(Roche社)。この反応は、Luminata classicウェスタンブロッティング基質(Millipore社)、及びImageQuant LAS 4000(Amersham社)による取込みを用いることで明らかとなった。

20

30

【0088】

ヒト血清中のオステオモジュリン及び存在し得る(possible)オステオモジュリンフラグメントの存在を検出するためのウェスタンブロッティングの結果を図2(レーンs59、s67、s62)に示す。骨芽細胞の培養上清において、分泌されたオステオモジュリンがおおよそ70kDa及び75kDaの2つの主要バンドに現れたが、おそらくはグルコシル化の変差のために、65kDa~120kDaでパターンが変動していた。オステオモジュリンバンドは、硬化性(SC)骨芽細胞よりも非硬化性(NSC)骨芽細胞でより強く現れた(図2、レーンNSC及びSC)。ヒト血清サンプルにおいて、オステオモジュリントタンパク質の主要形態(約54kDaで検出)が観察された。約42kDa、35kDa、及び30kDa(図2の矢印を参照されたい)にて微小形態も観察され、これは、タンパク質のフラグメントが循環血清中に存在していたことを示していた(図2、レーンs59、s67、s62)。

40

【0089】

図2に、オステオモジュリンのウェスタンブロッティング検出の結果を示す。示される各種レーンは下記のとおりである：rhOMD：ヒト組換えオステオモジュリン(陽性対照)、DMEM：濃度調整をしていない培養上清(陰性対照)、NSC：非硬化性骨芽細胞

50

胞の上清、SC：硬化性骨芽細胞の上清、s59、s67、s62：3人の健常な患者の血清。

【0090】

実施例5：オステオモジュリンの2つのフラグメントを標的とするELISAの開発

実施例2及び実施例4にて得られた結果、並びにデータマイニングから、本発明者らは、オステオモジュリンが幾つかのペプチドに切断された後に、これらのペプチドが血清に到達すると推測した。MMPの予測切断部位、体液のプロテオミクス研究、及びC末端の70残基が骨組織に残り、ヒドロキシアパタイトに連結することを考慮して、下記の2種のポリペプチドを生成し、骨関節炎の潜在的バイオマーカーとして確認した：OMD1
131 - KIDYGVFAKLPNLLQLHLEHNNLEEFPPPLPKSLER
LLLGYNELSKLQTNAMDGLVNLTMLDLCYNYLHDSLKDK
IFAKMEKLMQLNLC SNR - 223 (配列番号2)、及びOMD2 236 -
MYLSLENNSSISSIPEKYFDKLPKLHTLRMSHNKQLQDIPYN
IFNLPNIVELSVGHNKLLKQAF - 296 (配列番号3)。

10

【0091】

OMD1及びOMD2に対する抗血清の作製

オステオモジュリンフラグメントを血清中に見出すことができ、該フラグメントがバイオマーカーとしての役割を果たし得るといふ仮説を検証するために、BalbCマウスに、それぞれオステオモジュリンの2種のペプチド：OMD1a(148 - LEHNNLEEFPPPLPK - 162；配列番号4)及びOMD2a(261 - LRMSHNKQLQ
DIPYNI - 276；配列番号5) - K LH結合ペプチドに対する免疫を付与した。得られた2種の異なる抗血清は、これらの配列に特異的であり、Lumicanタンパク質に含まれる60%相同性の(homolog)ペプチドとは交差反応を示さなかった。さらに、OMD2に対する抗血清は、オステオモジュリンの配列268~290とは交差反応しなかった。スクリーニングを、ピオチン化ペプチドを用いて、K LH結合にシステインを添加せずに、ストレプトアビジン被覆96ウェルプレート上に固定して行った。競合ELISAを、競合因子として非ピオチン化ペプチド及び非結合ペプチドを用いて行った。標準曲線濃度は、520nM~8nMを含むものである。Fcフラグメント特異的なペルオキシダーゼAffiniPureヤギ抗マウスIgG(JacksonImmunoResearch社)を二次抗体(1:10000希釈)として使用した。ヒト血清希釈物は、Diluent Reagent Buffer(D-Tek社、ベルギー)の1:2~1:8希釈の標準曲線と平行することが分かった。アッセイを、ヒトの血清では1:3希釈、及びモルモットの血清では1:5希釈にて行った。培養上清は希釈せずにアッセイした。

20

30

【0092】

実施例6：オステオモジュリンフラグメントの検出にヒト血清を用いるELISA

実施例5で調製したOMD1及びOMD2に対するポリクローナル抗体を、ヒト血清中に存在し得るオステオモジュリンフラグメントをELISAによって検出するのに用いた。ヒト血清では、33人の健常患者及び24人のOA患者にてOMD1及びOMD2を定量した。健常集団において、11人が20歳~30歳であり、12人が31歳~45歳であり、10人が46歳~65歳であった。結果を図4にまとめる。OA集団における年齢範囲は、44歳~83歳であった。OMD1及びOMD2がどちらも、健常患者に対してOAで有意に低かった(それぞれ、 $p = 0.0137$ 及び 0.0013 、図4)。レベルは、男女間で有意差がなかった。OMD1レベルは、健常な患者では年齢について有意差がなかったが、OMD2レベルは、31歳~45歳群及び46歳~65歳群に比べて若い20歳~30歳の患者で低かった。

40

【0093】

実施例7：オステオモジュリンフラグメントの検出に骨芽細胞の培養上清を用いるELISA

さらに、実施例5で調製したOMD1及びOMD2に対するポリクローナル抗体を骨芽細胞の培養上清に存在し得るオステオモジュリンフラグメントを検出するのに用いて、E

50

ELISAを行った。これらのELISA試験では、骨芽細胞の培養上清におけるフラグメントを検出し、非硬化性セクレトームに対する硬化性セクレトームでのOMD 1及びOMD 2の減少も確認した。結果を図3にまとめる。この図には、非硬化性又は硬化性の前骨芽細胞及び骨芽細胞の培養上清におけるOMD 1及びOMD 2濃度が示されている。異なるドナーに由来する骨生検材料を用いて行った2つの独立実験の2つの培養物からの平均±SD。各実験では、各実験条件を3連で行った。平均値の比較を対応のあるt検定によって行った。

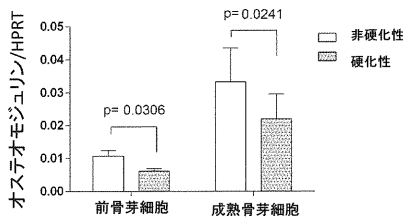
【0094】

実施例8：モルモットのOA自然発症モデル

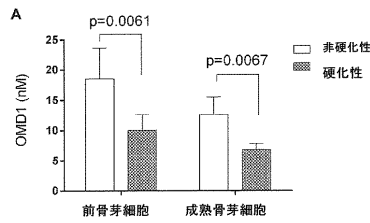
さらに、OMD 1及びOMD 2を、モルモットのOA自然発症モデルにて評価した。このモデルにおいて、モルモットはOAを発症し、35週齢にて、動物がOARSI組織学的スコアを用いて定量可能な重度のOA病変を呈した。15匹の動物を対照群に用い、15匹の動物を、31週間、効力のある(potential)抗OA治療にて治療した。動物の組織学的OAスコアの有意な低下の他に、血清中のOMD 1及びOMD 2レベルの増加傾向が観察された。結果を図5にまとめる。この図には、OAのモルモット血清中のOMD 1及びOMD 2の定量(nM単位)が示されている。

10

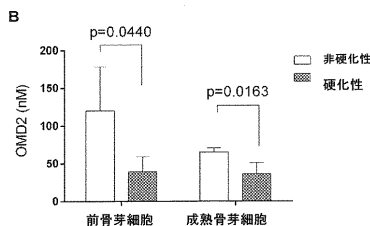
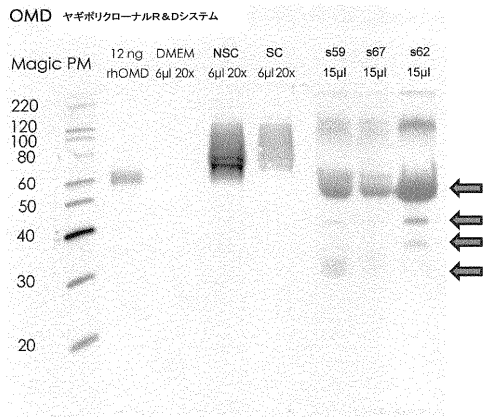
【図1】



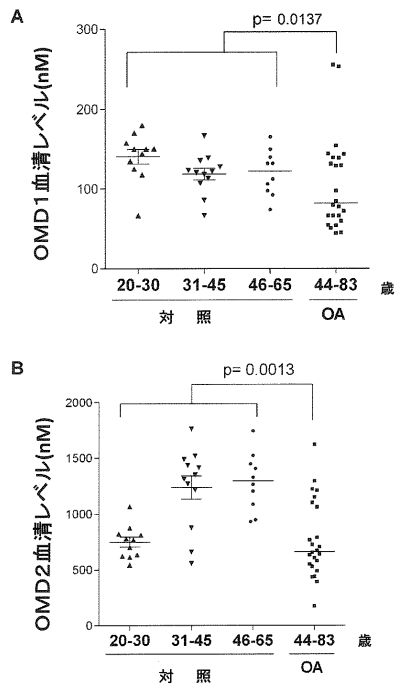
【図3】



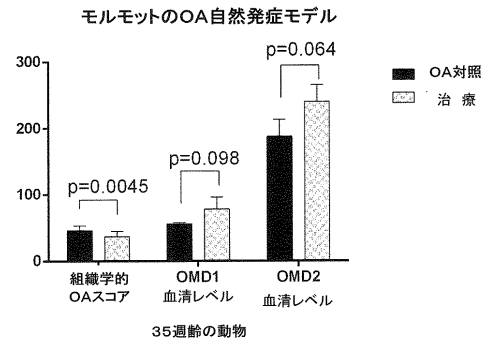
【図2】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配 列 表 】

[2019513223000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/080348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C07K16/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NINOMIYA ET AL: "Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 362, no. 2, 10 September 2007 (2007-09-10), pages 460-466, XP022240381, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2007.07.193 abstract page 461, right-hand column, lines 30-33; ----- -/--	1-7, 16-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 February 2017		06/03/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jacques, Patrice

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/080348

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2010/046443 A2 (BIOMARKER DESIGN FORSCHUNGS GM [AT]; WOLOSZCZUK WOLFGANG [AT]; HAWA GE) 29 April 2010 (2010-04-29) paragraph [0153] - paragraph [0154] paragraph [0185] - paragraph [0186] paragraph [0223]</p> <p>-----</p>	1-7, 16-19
Y	<p>BAY-JENSEN A C ET AL: "Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria", OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, vol. 24, no. 1, 31 January 2016 (2016-01-31), pages 9-20, XP029362524, ISSN: 1063-4584, DOI: 10.1016/J.JOCA.2015.10.014 table 1</p> <p>-----</p>	8-15
Y	<p>SANCHEZ-SABATE E ET AL: "Identification of differentially expressed genes in trabecular bone from the iliac crest of osteoarthritic patients", OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 17, no. 8, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 1106-1114, XP026319095, ISSN: 1063-4584, DOI: 10.1016/J.JOCA.2009.01.010 [retrieved on 2009-03-12] abstract page 1109, right-hand column, lines 12-13; figure 5</p> <p>-----</p>	8-15
A	<p>YVES HENROTIN ET AL: "Soluble biomarkers development in osteoarthritis: from discovery to personalized medicine", BIOMARKERS, vol. 20, no. 8, 17 November 2015 (2015-11-17), pages 540-546, XP055278126, GB ISSN: 1354-750X, DOI: 10.3109/1354750X.2015.1123363 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/080348

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DAVID J. HUNTER ET AL: "Biomarkers for osteoarthritis: Current position and steps towards further validation", BAILLIERE'S BEST PRACTICE AND RESEARCH. CLINICAL RHEUMATOLOGY, vol. 28, no. 1, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 61-71, XP055278181, GB ISSN: 1521-6942, DOI: 10.1016/j.berh.2014.01.007 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15
T	<p>Y. HENROTIN ET AL: "Osteoarthritis biomarkers derived from cartilage extracellular matrix: Current status and future perspectives", ANNALS OF PHYSICAL AND REHABILITATION MEDICINE, 1 April 2016 (2016-04-01), XP055278179, AMSTERDAM, NL ISSN: 1877-0657, DOI: 10.1016/j.rehab.2016.03.004 figure 2</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/080348

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010046443 A2	29-04-2010	CA 2739159 A1	29-04-2010
		CN 102203617 A	28-09-2011
		EP 2359145 A2	24-08-2011
		JP 2012506551 A	15-03-2012
		US 2011189694 A1	04-08-2011
		WO 2010046443 A2	29-04-2010

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74) 代理人 100209495

弁理士 佐藤 さおり

(72) 発明者 アンロータン、イヴ

ベルギー国、4000 リエージュ、アヴェニュー・イポクラート 13 (バット ペー 23)、ユニベルシテ・ド・リエージュ、ユニテ・ドウ・ルシエルシュ・スル・ロ・エ・ル・カルティラージュ(ウー・エル・オー・セー)

(72) 発明者 ソンシェ、クリステル

ベルギー国、4000 リエージュ、アヴェニュー・イポクラート 13 (バット ペー 23)、ユニベルシテ・ド・リエージュ、ユニテ・ドウ・ルシエルシュ・スル・ロ・エ・ル・カルティラージュ(ウー・エル・オー・セー)

(72) 発明者 ドウ・ポウ、エドウワン

ベルギー国、4000 リエージュ、アレー・デュ・シス・ウト 11 (バット ペー 6 セー)、ユニベルシテ・ド・リエージュ、ラボラトワール・ドウ・スペクトウロメトリ・ドウ・マッス(エル・エス・エム)、

(72) 発明者 マズッチェリ、ガブリエル

ベルギー国、4000 リエージュ、アレー・デュ・シス・ウト 11 (バット ペー 6 セー)、ユニベルシテ・ド・リエージュ、ラボラトワール・ドウ・スペクトウロメトリ・ドウ・マッス(エル・エス・エム)

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 DA36

4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 DA86 EA50

【要約の続き】

ントに特異的に結合する免疫学的結合パートナー、並びに該免疫学的結合パートナーを含むキットを提供する。

专利名称(译)	骨调节素和骨调节素片段作为骨关节炎的生物标志物及其用途		
公开(公告)号	JP2019513223A	公开(公告)日	2019-05-23
申请号	JP2018541155	申请日	2016-12-08
申请(专利权)人(译)	Yuniberushite列日		
发明人	アンロータン、イヴ ソンシエ、クリステル ドゥ・ポウ、エドゥワン マズッチェリ、ガブリエル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K16/28 C07K2317/34 G01N33/6887 G01N2333/51 G01N2333/78 G01N2800/105 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D C07K14/47 C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA36 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50		
代理人(译)	Kajinami秩序 佐藤沙织		
优先权	2016162499 2016-03-25 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及骨调节蛋白 (OMD) 蛋白或骨调节蛋白 (OMD) 蛋白，其用于哺乳动物，优选人类个体的骨关节炎和/或软骨下骨硬化的预后和/或诊断。在片段上。本发明涉及预测和/或诊断骨关节炎和/或软骨下骨硬化的方法，包括：i) 哺乳动物个体体液样品中的骨调节素，优选人血清样品测量 OMD) 蛋白质或片段 (一种或多种) 的骨调节蛋白 (OMD) 蛋白质，ii) 骨髓调节素 (OMD) 蛋白质或其片段至健康个体的体液中的水平，优选血清确定 (在某些情况下) 水平的降低表明骨关节炎和/或软骨下骨硬化的发作。本发明还涉及骨调节蛋白 (OMD) 蛋白或骨调节蛋白 (OMD) ，其用于哺乳动物，优选人类个体的骨关节炎和/或软骨下骨硬化的预后和/或诊断。提供了特异性结合蛋白质片段的免疫结合配偶体，以及包含免疫结合配偶体的试剂盒。

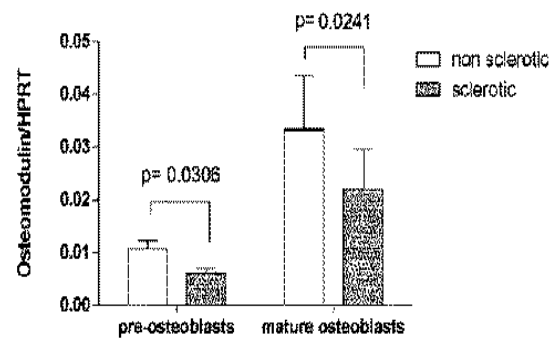


Fig. 1